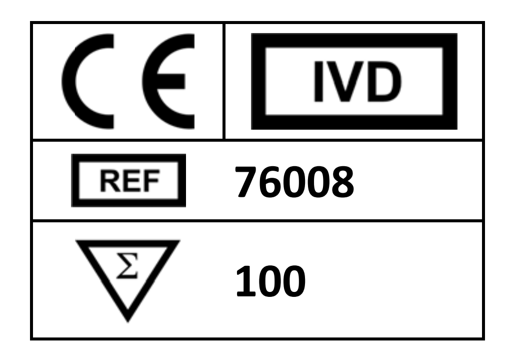


Kit AmplideX™ *FMR1* PCR

Instrucciones de uso



Únicamente para exportación


Asuragen, Inc.


2170 Woodward St.
Austin, TX 78744-1840
EE.UU.
+1.512.681.5200



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH
La Haya, Países Bajos
+31.70.345.8570

Eine gültige Version dieser Gebrauchsanweisungen auf Deutsch kann kostenlos erhalten werden, sich mit Ihrem lokalen Verteiler in Verbindung setzend.

Une version valide de ces instructions d'utilisation en français peut être obtenue gratuitement en contactant votre distributeur local.

Una versión válida de estas instrucciones para uso en español puede ser obtenida gratuitamente al ponerse en contacto con su distribuidor local.

Umaversão válida dessasinstruções de uso emportuguês pode ser obtida gratuitamente ao contacto com o seu representante local.

Una versione valida di queste istruzioni per l'uso in italiano può essere gratuitamente ottenuta contattando il suo distributore locale.

Een geldige versie van de gebruiksaanwijzingen in het Nederlands kan gratis verkregen worden door uw plaatselijke vertegenwoordiger te contacteren.

Índice

Indicaciones

El kit AmplideX™ *FMR1* PCR es una herramienta de diagnóstico in vitro diseñado para uso profesional en laboratorios clínicos a fin de amplificar y detectar las secuencias repetidas del triplete citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5’ no traducida del gen 1 del retraso mental del X frágil (*FMR1*). El kit está concebido como ayuda para diagnosticar el síndrome del X frágil y los trastornos asociados al mismo, como el síndrome de temblor/ataxia (FX-TAS) y la insuficiencia ovárica primaria (FX-POI), a través de la determinación del número de repeticiones CGG hasta 200 CGG y la detección de alelos con más de 200 CGG. La prueba consta de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de ADN genómico purificado de sangre completa, seguida de electroforesis capilar en un analizador genético general validado en laboratorio o en una plataforma de electroforesis capilar, y la conversión del tamaño del producto en el número de repeticiones CGG.

Generalidades

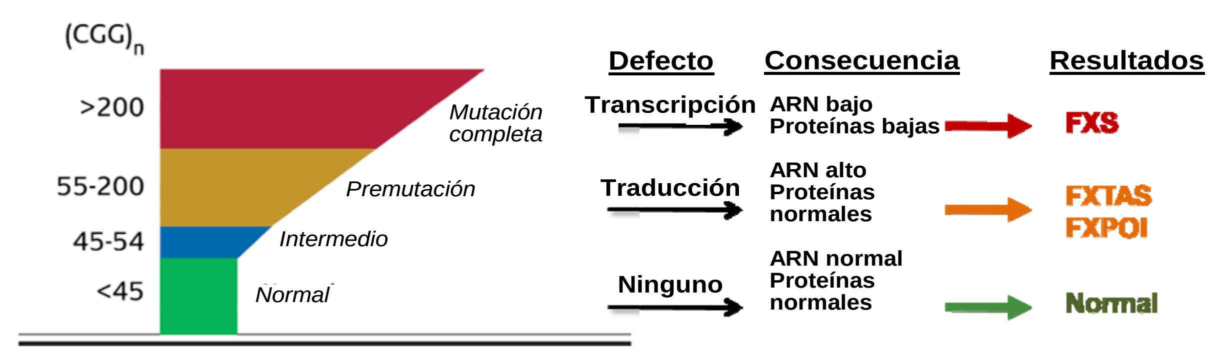
El síndrome del X frágil (FXS) hace referencia a un trastorno en la repetición de trinucleótidos que tiene su causa principal en la expansión de las secuencias repetidas del triplete citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5’ no traducida del gen 1 del retraso mental del X frágil (*FMR1*, NM_002024.4) [1]. El número de repeticiones CGG se asocia a diversos trastornos que pueden afectar tanto a pacientes jóvenes como adultos [2]. La expansión a 200 repeticiones o más da lugar a la inactivación del gen *FMR1* a través de la metilación de las repeticiones CGG y de la isla CpG adyacente al gen *FMR1*. La proteína *FMR1* es una proteína de unión al ARN que actúa como regulador global de la traducción en las neuronas y resulta muy importante para la plasticidad sináptica [3]. Dada su función clave en el desarrollo nervioso y en el transporte del ARN [4], este gen se considera responsable de diversos trastornos relacionados con el X frágil.

Los individuos con mutaciones completas (más de 200 repeticiones CGG) presentan con frecuencia el FXS clásico, caracterizado por retraso mental, autismo y desórdenes emocionales y psiquiátricos [5]. Se sabe que los portadores de la premutación (55-200 o 59-200 CGG) entrañan el riesgo de desarrollar insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FX-POI), una de las causas principales de las disfunciones ováricas en mujeres [5], y síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil (FX-TAS), que se relaciona principalmente con la enfermedad de Parkinson o con la demencia en varones portadores de la premutación mayores de 50 años. Los fenotipos de la premutación se asocian a un exceso del ARN mensajero y, en consecuencia, a una toxicidad del ARN y a un trastorno en la regulación de numerosas proteínas [6]. En muchos niños con alelos con la premutación del *FMR1* también se han encontrado deficiencias en el desarrollo, sobre todo en lo que respecta a la atención y la comunicación social [7]. De esta forma, el síndrome del X frágil y sus trastornos asociados afectan a un amplio espectro de individuos de todas las edades y de numerosas condiciones mentales y de salud. Las pruebas del síndrome del X frágil solamente deben realizarse después de un asesoramiento exhaustivo y con el consentimiento informado del paciente al que se le vayan a hacer.

Evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo y la interpretación clínica del FXS y de los trastornos relacionados se determinan por el número de repeticiones CGG y por el estado de metilación del gen. Según el número de repeticiones CGG se distinguen cuatro tipos de alelos: alelos no afectados o normales, alelos intermedios (también llamados alelos en “zona gris”), alelos con premutación y alelos con mutación completa (>200 CGG). En la Figura 1 se presenta la relación entre la longitud de las repeticiones CGG, el defecto y el fenotipo.

Figura 1. Relación entre las longitudes de las repeticiones CGG y los fenotipos correspondientes. Los tamaños de repetición se dividen en cuatro categorías: normal (verde), intermedio (azul), con premutación (naranja) y con mutación completa (rojo). Los rangos específicos de repeticiones asociados a estas longitudes se muestran en la Tabla 12.



Los alelos con mutación completa abarcan de 200 a más de 1.000 repeticiones. Por encima de 200 repeticiones, el fenotipo del FXS se asocia al estado de metilación del alelo, y no necesariamente al número de repeticiones superiores a 200 CGG [8]. En el caso de los alelos con premutación (de aprox. 60 a 200 repeticiones), el riesgo de expansión a una mutación completa aumenta con el tamaño. Por encima de 100 repeticiones, existe un riesgo sistemático de expansión en la siguiente generación [9].

Además de los riesgos asociados a la longitud total de repeticiones CGG, muchos alelos del *FMR1* contienen secuencias AGG que se intercalan entre las repeticiones CGG. Se piensa que las "interrupciones" AGG confieren estabilidad al ADN y reducen el riesgo de expansión en la generación siguiente [10-13]. El riesgo en el caso de madres sin elementos AGG puede ser mayor que en el de madres con el mismo número de repeticiones, pero con al menos una secuencia AGG y, por consiguiente, con menos secuencias $(CGG)_n$ consecutivas.

Diagnóstico molecular del X frágil

La mayor parte de los modelos de pruebas diagnósticas para el *FMR1* se basa en la PCR con resolución de tamaño por electroforesis capilar (EC), o mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, para detectar hasta 100-150 repeticiones CGG. El método de Southern blot para el FMR1 se utiliza para caracterizar muestras con números de repeticiones CGG demasiado grandes para amplificarlas mediante la PCR, así como para determinar el estado de metilación del gen [14]. Por desgracia, esta técnica es costosa, requiere mucho tiempo y trabajo de laboratorio y, además, necesita grandes cantidades de ADN genómico, por lo que no es adecuada para pruebas con gran cantidad de muestras ni para la identificación sistemática de la población. La PCR puede solventar potencialmente cada una de estas limitaciones, pero la alta riqueza en GC de la secuencia de repeticiones del triplete del X frágil ha dificultado siempre la amplificación. La PCR de ADN de mujeres con premutación y mutación completa es incluso más problemática debido a la amplificación preferente del alelo más pequeño [15]. En consecuencia, más del 20% de las muestras de mujeres que son biológicamente homocigotas debe analizarse por Southern blot para resolver la ambigüedad potencial de un alelo más largo no amplificado. Como resultado, muchas de las muestras, si no todas, evaluadas en laboratorios clínicos, se analizan también con el método de Southern blot, más complejo. Por este motivo, la técnica actual de análisis clínico de X frágil es laboriosa, tiene bajo rendimiento y es costosa, por lo que no puede satisfacer adecuadamente las necesidades de las pruebas de rutina.

El kit AmplideX™ *FMR1* PCR se ha diseñado para solucionar estos problemas. Dicho kit se utiliza para determinar el número de repeticiones CGG en el gen *FMR1* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar (EC). El uso del kit permite medir de forma precisa los alelos de hasta 200 CGG, así como identificar los alelos con mutación completa con más de 200 CGG y detectar un perfil de picos característico que resuelve la cigosidad en muestras de mujeres.

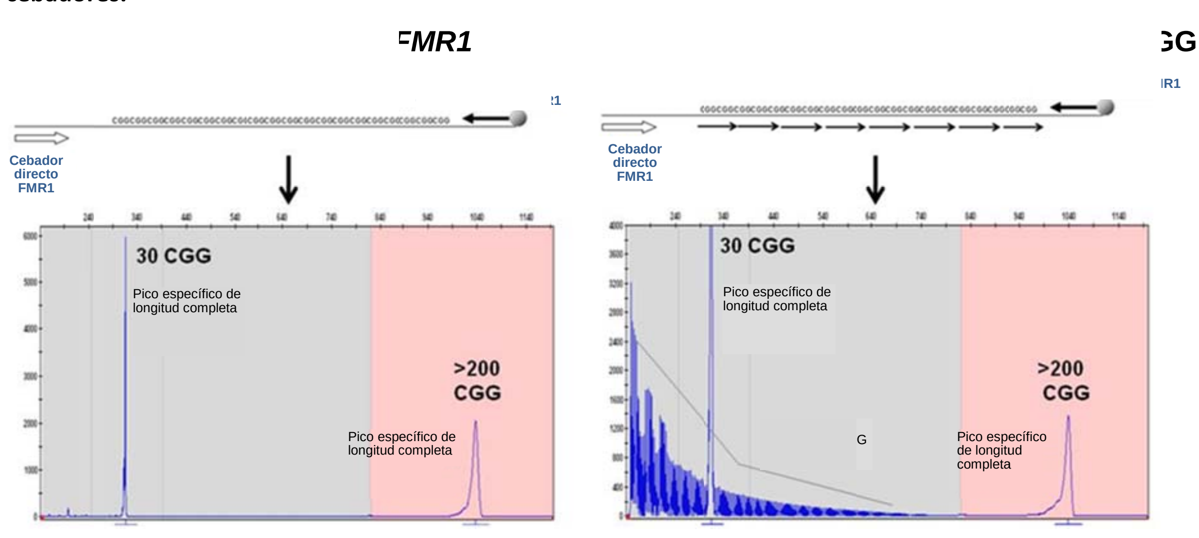
Principio de la prueba

El kit AmplideX™ *FMR1* PCR se basa en una reacción de PCR con tres cebadores repetidos (RP) CGG, a partir de ADN genómico purificado y medición de fragmentos en una plataforma validada de electroforesis capilar (como puede ser un analizador genético de Applied Biosystems). El kit incluye cebadores específicos del gen y cebadores de la zona CGG, una mezcla de polimerasa, un tampón para la amplificación de la región de repeticiones CGG en el gen *FMR1* y un marcador ROX 1000 para la medición mediante electroforesis capilar. El tamaño de los productos de PCR se transforma en número de repeticiones CGG utilizando los factores de conversión de tamaño y movilidad. Los usuarios también pueden optar por realizar una PCR específica del gen con dos cebadores, omitiendo el cebador CGG.

Métodos para la PCR

El kit incluye reactivos para realizar 2 tipos de PCR: PCR específica del gen (GS-PCR) y PCR con cebadores repetidos (CGG RP PCR) (Figura 2). La PCR específica del gen utiliza dos cebadores específicos del gen FMR1 que abarcan la región de repeticiones CGG. Los productos de la PCR con los cebadores específicos del gen representan alelos de longitud completa (Figura 2A). La PCR con cebadores repetidos (RP) CGG se diferencia de la PCR específica, más convencional, por la adición de un tercer cebador, que es complementario a la región de repeticiones del triplete del gen *FMR1*. El electroferograma resultante incluye los productos PCR de longitud completa generados a partir de los cebadores específicos que abarcan la región de repeticiones CGG y los picos de repeticiones CGG obtenidos por la RP PCR (Figura 2B). Los picos específicos de longitud completa son similares en los dos métodos. Los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG corresponden a los amplicones de la PCR individuales de cada combinación del cebador repetido con el cebador inverso. Los picos correspondientes a las repeticiones CGG están separados por 3 pb, como es de esperar. El perfil de picos ofrece una información de confirmación sobre la cigosidad y la presencia de secuencias AGG intercaladas.

Figura 2. Metodologías de PCR para el *FMR1*, señalando las características de los sistemas de PCR de dos y tres cebadores.



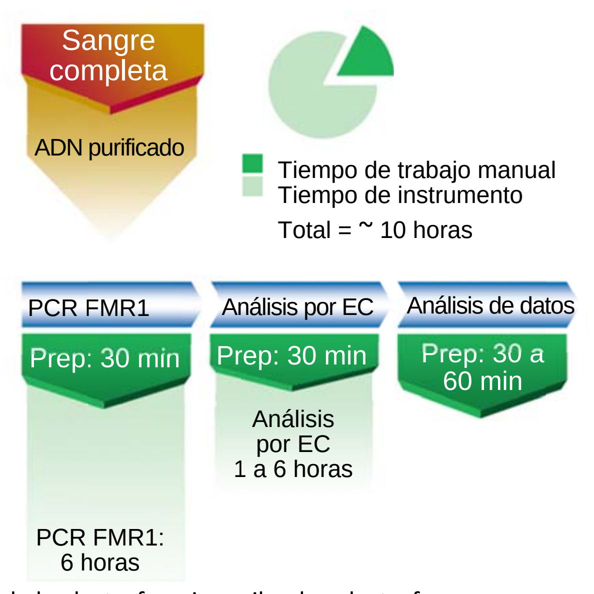
El perfil de repetición de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG puede anunciar la presencia de alelos más largos en la amplificación, independientemente de si estos alelos se detectan como productos de longitud completa. En consecuencia, el riesgo de pérdida del alelo más largo en la PCR se reduce. Los picos de producto de PCR específica de longitud completa pueden convertirse a partir del tamaño en pares de bases en el número de repeticiones CGG, utilizando para ello factores de conversión predefinidos. En teoría, el perfil de picos puede ofrecer una cuantificación muy precisa de las repeticiones $(CGG)_n$, contando el número de picos de amplicones obtenidos con el cebador repetido hasta ~200 CGG, ofreciendo una confirmación complementaria del tamaño.

Protocolo de trabajo

El protocolo de trabajo de la prueba incluye una configuración de la mezcla maestra de PCR, un programa de ciclos térmicos y un análisis usando electroforesis capilar. El ADN genómico se añade a una mezcla maestra que contiene tampón de

amplificación para secuencias ricas en GC, una mezcla de polimerasa y los cebadores F,R FAM del *FMR1* para la PCR específica. El cebador CGG del *FMR1* se añade también a la mezcla maestra para realizar la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG. Después del programa térmico, que dura aproximadamente 6 horas, los productos de PCR no purificados se mezclan directamente con formamida Hi-Di y el marcador ROX 1000. Después de desnaturalizar los productos, los amplicones se miden en una plataforma validada de electroforesis capilar (como puede ser un analizador genético de Applied Biosystems usando el polímero POP-7). En la Figura 3 se muestra un esquema de la secuencia de trabajo.

Figura 3. Visión global del protocolo de trabajo del kit AmplideX™ *FMR1* PCR, donde se muestran los pasos clave y el tiempo estimado para cada paso (el programa térmico para la PCR específica dura aproximadamente 3,5 horas). El protocolo de análisis por EC requiere aproximadamente 1 hora de tiempo de carrera para cada conjunto de 4 a 96 muestras por inyección, dependiendo del modelo utilizado.



Después de la electroforesis capilar, los electroferogramas se analizan para identificar picos de producto específicos de longitud completa. Hasta aproximadamente 200 CGG, los picos se detectan dentro del rango lineal del instrumento. El tamaño en pares de bases de estos picos se convierte en número de repeticiones CGG, utilizando para ello factores de corrección calculados específicamente según la configuración del equipo. Por encima de 200 CGG, el tamaño del producto de la PCR supera el umbral de resolución del gel polímero POP-7. Los fragmentos de PCR que superan este umbral tienen un índice de migración equivalente independiente del tamaño del producto [16]. De este modo, los productos de PCR del *FMR1* que superan 200 CGG se identifican en la categoría de >200 CGG. Además de proporcionar información sobre el tamaño, los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG pueden indicar características cualitativas, tales como la cigosidad y la presencia de AGG intercalado [17].

Componentes del kit

Reactivos suministrados con el kit

Tabla 1. Componentes del kit AmplideX™ *FMR1* PCR (P/N 76008)

N.º de elemento	Descripción	Volumen	Temperatura de almacenamiento
145185	Cebadores F,R FAM del *FMR1*	50 µl	De -15 a -30 °C
145184	Cebador CGG del *FMR1*	50 µl	De -15 a -30 °C
145186	Tampón de amplificación	1,2 ml	De -15 a -30 °C
145187	Mezcla de polimerasa	5 µl	De -15 a -30 °C
145188	Marcador ROX 1000	200 µl	De -15 a -30 °C
145183	Diluyente	1,0 ml	De -15 a -30 °C

Manipulación y conservación

- Guarde los reactivos en un congelador que no tenga sistema “no-frost” y en la oscuridad, a una temperatura comprendida entre -15 °C y -30 °C.
- Deje que los reactivos (a excepción de la mezcla de polimerasa) se descongelen a temperatura ambiente antes de su uso. Una vez finalizada la descongelación, agite en vórtex todos los reactivos (excepto la mezcla de polimerasa).
- Antes de abrir los frascos, centrifugue brevemente cada componente para recoger las soluciones en el fondo de los frascos.
- La preparación del ensayo debe realizarse a temperatura ambiente (intervalo aproximado de 18 °C a 25 °C).

Número de reacciones

- Los reactivos proporcionados son suficientes para un total de 100 reacciones, PCR específica del gen o PCR con cebadores repetidos (RP) CGG y los 100 análisis subsiguientes por EC.
- Los reactivos se han verificado para su uso en hasta cuatro ciclos de congelación y descongelación. No se recomienda realizar ciclos adicionales.
- Las mezclas maestras pueden prepararse para el número apropiado de muestras con un número mínimo recomendado de 16 reacciones por serie.

Estabilidad de los reactivos

- Si se conserva en las condiciones especificadas, el producto mantendrá su eficacia hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Calibradores y controles

- El kit no incluye calibradores ni controles, pero se recomienda utilizarlos en cada serie.
- El diluyente proporcionado con el kit puede utilizarse como control negativo sin ADN.
- El estándar internacional de la OMS, síndrome del X frágil, panel de referencia genético (NIBSC, 08/158) u otros estándares de ADN de línea celular disponibles en el mercado pueden utilizarse como controles positivos.

Reactivos requeridos pero no suministrados

- El kit no incluye los reactivos requeridos para el aislamiento del ADN. El ADN puede extraerse mediante las metodologías ordinarias de preparación de muestras validadas por el laboratorio que aseguren un ADN intacto y de alta calidad.

Otros componentes suministrados con este kit

- PC-0165: Kit AmplideX™ *FMR1* PCR, tarjeta del envase

Consumibles y equipos requeridos pero no suministrados

- Material general de laboratorio y espacio de trabajo para realizar PCR
- Termociclador: ABI 9700, ABI Veriti (ejecución en modo 9700 máx.) o MJ Research PTC-225
- Centrífuga para placas de 96 pocillos
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Pipetas: con una precisión comprendida entre 0,2 y 2 µl, 1 y 10 µl, 2 y 20 µl, 20 y 200 µl, y 100 y 1.000 µl
- Pipeta multicanal capaz de pipetear entre 1 y 10 µl
- Placas de PCR de 96 pocillos: ABgene® n.º AB-0900 o equivalente
- Sellos de placas de PCR: ABgene® n.º AB-0558, Phenix LMT-0028 o equivalente
- Soporte de compresión de PCR: Applied Biosystems n.º 4312639 o equivalente
- Plataformas y materiales de electroforesis capilar validados en laboratorio
- Analizadores genéticos ABI compatibles con el polímero POP-7 (por ejemplo, series 3130, 3730 o 3500).
- Polímero POP-7: Applied Biosystems, n.º 4363785 o equivalente
- Formamida Hi-Di: Applied Biosystems, n.º 4311320 o equivalente
- Calibradores para los colorantes FAM y ROX, DS-30 o DS-31: Applied Biosystems n.º 4345827, n.º 4345829, o equivalente
- Software GeneMapper 4.0/4.1 o equivalente

Advertencias y precauciones

- Utilice un equipo de protección personal adecuado. Lleve gafas de protección apropiadas, guantes protectores y ropa protectora al trabajar con estos materiales.
- Al manipular muestras humanas, siga las precauciones universales indicadas por la OSHA 1910:1030, CLSI M29, u otras guías pertinentes.
- **ADVERTENCIA: RIESGO QUÍMICO.** Formamida Hi-Di™. Provoca irritación en los ojos, la piel y las vías respiratorias. Riesgos para el desarrollo y posibilidad de malformaciones del feto. Evite inhalar el vapor. Asegúrese de que existe una ventilación adecuada.
- Entre las sustancias que pueden interferir con el kit cabe citar ciertos fármacos y la heparina. No deben utilizarse muestras altamente lipémicas, hemolizadas, ictéricas ni muestras con proteinemia.
- Utilice puntas de pipeta con filtro sin nucleasas y tubos sin nucleasas.
- La contaminación cruzada de la PCR puede producir señales positivas falsas. Utilice las precauciones apropiadas al manipular las muestras, en el flujo de trabajo y al pipetear.
- No mezcle componentes de diferentes lotes de reactivos. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en el envase.
- No intercambie tapones de tubos de reactivos que pudieran causar contaminación cruzada o degradación de los reactivos.
- Utilice técnicas de pipeteado adecuadas y mantenga el mismo patrón de pipeteado durante todo el procedimiento para garantizar resultados óptimos y reproducibles. Asegúrese de que existe una distribución homogénea de la mezcla maestra; es viscosa y puede acumularse dentro de la punta de la pipeta.
- Utilice métodos y plataformas validados en laboratorio.

- Antes de su uso, asegúrese de que todos los instrumentos se han calibrado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Pueden solicitarse las fichas de datos de seguridad. Póngase en contacto con su distribuidor local.

Pasos previos al análisis

El ADN genómico extraído mediante metodologías de preparación de muestras estándar de sangre completa recogida en EDTA es compatible con el kit AmplideX™ *FMR1* PCR. Se recomienda evaluar la concentración (OD260) y pureza (OD260/280) del ADN genómico purificado, así como almacenar las muestras de ADN a una temperatura inferior a -15 °C. Añada de 20 a 80 ng en cada reacción (2 µl de ADN a 10-40 ng/µl).

Protocolo del kit AmplideX™ *FMR1* PCR

Descripción general

El protocolo de la prueba implica tres series clave de procedimientos:

1. Configuración de la mezcla maestra de la PCR y procesamiento en termociclador
2. Electroforesis capilar
3. Análisis del tamaño de los fragmentos

Las instrucciones que se incluyen a continuación están concebidas para la preparación y el análisis de productos de la PCR específica o la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG. Solo hay dos diferencias en el protocolo: preparación de las mezclas maestras de PCR con o sin el cebador CGG del *FMR1* y las diferentes condiciones del ciclo. El protocolo está concebido para una sola reacción; las mezclas maestras pueden prepararse para el número apropiado de reacciones en cada paso del protocolo. Los reactivos suministrados son suficientes para un total de 100 reacciones ejecutadas en hasta cuatro sesiones independientes, incluido un 10% de excedente para la preparación de reacciones adicionales (por ejemplo, una serie con 100 reacciones o cuatro series con 25 reacciones). El número mínimo de reacciones por sesión es 16 y no se admiten más de cuatro ciclos de congelación y descongelación. En la Tabla 2 se incluyen ejemplos del excedente recomendado para un número de muestras dado.

Tabla 2. Ejemplos de configuración de la mezcla maestra para la PCR.

Número de muestras	Excedente recomendado
16	+2
25	+2
50	+5
100	+10

El flujo de trabajo debe desarrollarse de manera unidireccional comenzando en un área de pre-amplificación y moviéndose a un área de pos-amplificación. El producto amplificado debe permanecer en el área de pos-amplificación para reducir el riesgo de contaminación de los amplicones.

Configuración de la mezcla maestra de PCR y programa térmico

1. Descongele todos los reactivos, a excepción de la mezcla de polimerasa, durante unos 10 minutos a temperatura ambiente. Coloque la mezcla de polimerasa en hielo. Agite brevemente en vórtex todos los tubos (tres a cinco pulsos en vórtex), a excepción de la mezcla de polimerasa.

   Nota: La mezcla de polimerasa debe conservarse en hielo en todo momento. El tampón de amplificación puede tener una precipitación observable cuando está frío. Después de haber descongelado el tubo por completo, agite en vórtex para garantizar una mezcla homogénea.

2. Añada los componentes adecuados a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml en el orden exacto que se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3. Configuración de la mezcla maestra de la PCR.

Componente	PCR específica	PCR con cebadores repetidos (RP) CGG
Tampón de amplificación	11,45 µl	11,45 µl
Cebadores F,R FAM del *FMR1*	0,50 µl	0,50 µl
Cebador CGG del *FMR1*	0 µl	0,50 µl
Diluyente	1,00 µl	0,50 µl
Mezcla de polimerasa	0,05 µl	0,05 µl
Muestra de ADN	2,00 µl	2,00 µl
Volumen total por reacción	**15,00 µl**	**15,00 µl**

Nota: El tampón de amplificación es viscoso; retraiga el pistón lentamente para obtener la solución.

Importante: Un exceso de mezcla de polimerasa puede inhibir la reacción. Asegúrese de que no haya gotas adicionales en la punta de la pipeta antes de dispensarla a la mezcla maestra.

3. Agite en vórtex la mezcla por completo (tres a cinco pulsos en vórtex) antes de distribuir la mezcla en la placa o en los tubos de tiras de PCR.

   Atención: La mezcla maestra debe agitarse en vórtex antes de dispensarla para garantizar una mezcla adecuada de todos los reactivos.

4. Dispense 13,0 µl de mezcla maestra en cada pocillo o tubo. Utilice una pipeta repetidora, si dispone de ella. Cambie la punta de la pipeta al comienzo de cada columna de la placa si está usando una pipeta estándar.

5. Añada 2,0 µl de la muestra de ADN apropiada en cada pocillo. Pipetee hacia arriba/hacia abajo al menos dos veces para garantizar una mezcla correcta.

6. Selle la placa con película adhesiva; asegúrese de que todos los pocillos y bordes de la placa están cerrados herméticamente.

7. Agite en vórtex la placa con suavidad.

8. Centrifugue la placa para eliminar las burbujas que pudiera haber (1 minuto a 1.600 rcf).

   Importante: Asegúrese de que todas las burbujas se han eliminado de los pocillos.

9. Transfiera la placa de PCR cerrada herméticamente a un termociclador preprogramado y ejecute el protocolo de ciclo apropiado de la Tabla 4:

Tabla 4. Protocolos de termocicladores.

PCR específica	
Descripción	**Duración**
Desnaturalización	98 °C durante 5 min
25 ciclos	97 °C durante 35 seg
	62 °C durante 35 seg
	72 °C durante 4 min
Extensión	72 °C durante 10 min
Pausa	4 °C ∞

PCR con cebadores repetidos (RP) CGG	
Descripción	**Duración**
Desnaturalización	95 °C durante 5 min
10 ciclos	97 °C durante 35 seg
	62 °C durante 35 seg
	68 °C durante 4 min
20 ciclos	97 °C durante 35 seg
	62 °C durante 35 seg
	68 °C durante 4 min + **20 seg/ciclo***
Extensión	72 °C durante 10 min
Pausa	4 °C ∞

*Siga el manual de instrucciones del termociclador para añadir 20 segundos de extensión por ciclo en este paso.

10. Transfiera los productos de PCR para el análisis por EC o almacénelos a una temperatura comprendida entre -15 °C y -30 °C hasta que se proceda al análisis. La estabilidad del producto de PCR a una temperatura comprendida entre -15 °C y -30 °C se ha verificado para un almacenamiento de hasta 10 días.

Electroforesis capilar con POP-7

1. Descongele la formamida Hi-Di™ y el marcador ROX 1000 a temperatura ambiente. Agite bien en vórtex (15 segundos) y centrifugue los tubos antes de su uso.

2. Prepare una solución de mezcla maestra añadiendo los componentes en el orden siguiente:

Formamida Hi-Di™	11 µl
Marcador ROX 1000	2 µl
Volumen total por pocillo	**13 µl**

3. Mezcle todos los reactivos añadidos (agitando en vórtex por pulsos de tres a cinco veces) y centrifugue brevemente para recogerlos en el fondo del tubo.

4. Distribuya en alícuotas de 13,0 µl la solución de formamida Hi-Di™/ROX en cada pocillo de una nueva placa de análisis por EC.

   Importante: Las muestras deben coincidir con la configuración de la inyección en el analizador genético (por ejemplo, A1-H2, A3-H4…A11-H12) en los grupos apropiados de 8, 16 o 24 capilares. Si se ejecutan menos muestras del número predeterminado para cualquier grupo de inyección, rellene los pocillos vacíos sujetos a inyección con 15 µl de formamida Hi-Di.

5. Transfiera 2 µl de productos PCR a la placa de EC y pipetee arriba y abajo de 2 a 3 veces para mezclar bien. Se recomienda una pipeta multicanal para la transferencia.

6. Cierre herméticamente la placa, agite en vórtex, centrifugue para eliminar las burbujas y transfiera a un termociclador.

7. Desnaturalice durante 2 min a 95 °C seguido de 4 °C hasta que esté listo para la inyección en el instrumento de EC. Si se desea, los productos también pueden conservarse en hielo y protegerse de la luz después del paso de desnaturalización.

   Atención: Las muestras deben desnaturalizarse antes del análisis por EC.

   Nota: Las muestras pueden ejecutarse hasta 24 horas después de la desnaturalización.

8. Prepare el analizador genético para la adquisición de datos según las instrucciones del fabricante. La inyección final y las condiciones de carrera deben ser validadas por el usuario final y pueden diferir entre instrumentos. Se aplican las siguientes consideraciones:
   - El instrumento debe estar calibrado para la detección de los colorantes fluorescentes FAM y ROX.
   - Use el protocolo de análisis de fragmentos instalado de fábrica para el polímero POP-7 y la longitud capilar de su instrumento como protocolo base.
   - Ajuste las condiciones de inyección y el tiempo de carrera según la configuración concreta del instrumento y la longitud capilar. Los valores de inicio recomendados se indican en la Tabla 5.

   Tabla 5. Ajustes relativos a la inyección y al tiempo de carrera de los protocolos predeterminados de análisis de fragmentos para diferentes clases de instrumentos y longitudes de capilar que ejecutan el polímero POP-7.

Instrumento	Longitud de capilar	Inyección	Tiempo de carrera
3130, 3130*xl*	36 cm	2,5 kV, 20 s	2.400 s
3730, 3730*xl*	50 cm	2,5 kV, 20 s	4.200 s
3500, 3500xL	50 cm	2,5 kV, 20 s	2.400 s

9. Después de la ejecución, los datos pueden analizarse para ver el tamaño del amplicón y realizar la conversión a número de repeticiones CGG.

Análisis del tamaño de los fragmentos

El análisis del tamaño de los fragmentos de la PCR específica o con cebadores repetidos (RP) CGG implica una serie de pasos para obtener el tamaño de picos de producto de longitud completa, así como para identificar las características de la carrera para la correcta interpretación de los datos. Los resultados se convierten en longitud de repeticiones CGG tal como se describe en la sección de interpretación de los datos. El análisis del tamaño de los fragmentos de la PCR específica o con cebadores repetidos (RP) CGG se realiza utilizando GeneMapper 4.0/4.1. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el procedimiento informático (página 14).

Procedimiento de calibración

Procedimiento de calibración utilizado para determinar los factores de corrección de tamaño y movilidad

Los factores de corrección de tamaño (c_0) y movilidad (m_0) dependen del instrumento, así como del tipo de polímero, de la longitud del capilar y de las condiciones del ensayo utilizadas, y pueden variar ligeramente de un laboratorio a otro. Esta sección describe cómo determinar un factor de conversión específico del laboratorio utilizando el tamaño en pares de bases de los amplicones de alelos de un control agrupado de líneas celulares. Este control también puede usarse como un control de la carrera de rutina con cada serie de PCR.

El control agrupado se prepara mezclando 4 moldes de ADN de líneas celulares disponibles comercialmente (consulte http://ccr.coriell.org). Prepare las diluciones de cada ADN de línea celular de Coriell en Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,8 y combine tal como se muestra en la Tabla 6 que se incluye a continuación.

Tabla 6. Formulación del control agrupado utilizando ADN de 4 líneas celulares del CCR.

Número de catálogo	Repeticiones indicadas en el catálogo	Longitud de repeticiones CGG por AmplideX™	Concentración final
NA20239	20, 183-193	20, 199	10 ng/µl
NA07541	29, 31	29, 31	5 ng/µl
NA20230	54	54	12 ng/µl
NA06891	118	119	10 ng/µl

Los términos para c_0 y m_0 se derivan de un acoplamiento lineal de la longitud de repeticiones CGG esperada y del tamaño en pares de bases para los primeros cinco picos de los alelos del control agrupado, a saber, los alelos de 20, 29, 31, 54 y 119 CGG. El alelo 199 CGG no se utiliza para este gráfico, ya que su longitud no se ha verificado por secuenciación. Para calcular factores de conversión específicos, siga estos pasos:

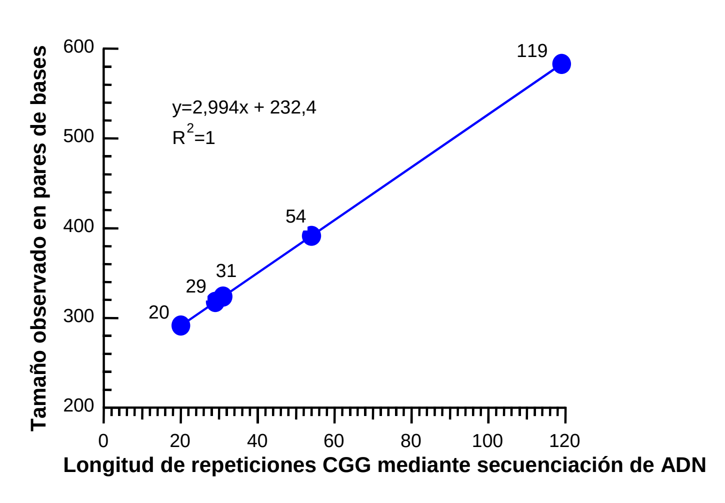
1. Analice el control agrupado con el kit AmplideX™ *FMR1* PCR y determine el tamaño medido en pares de bases para cada uno de los cinco primeros picos de amplicones. Se recomienda calcular el tamaño medio en pares de bases para cada pico de al menos dos series independientes.

Tabla 7. Datos de ejemplo para comparar la longitud de repeticiones esperada y el tamaño observado.

Longitud de repeticiones	Tamaño observado
20	291,43 pb
29	317,78 pb
31	323,65 pb
54	391,30 pb
119	582,87 pb

2. Calcule la pendiente y la intersección de los datos correlacionados en Excel o en un programa similar.

Figura 4. Gráfico de ejemplo para el cálculo de los factores de corrección para las repeticiones CGG.



La intersección del acoplamiento lineal corresponde al factor de corrección c_0, y la pendiente, al factor de movilidad m_0. En este ejemplo, c_0=232,4 y m_0=2,944.

Para comprobar los factores de corrección derivados, el usuario debe comprobar el estándar internacional de la OMS, Fragile X Syndrome, Genetic Reference Panel (NIBSC, 08/158) u otros estándares de ADN de línea celular disponibles en el mercado.

Procedimiento de control

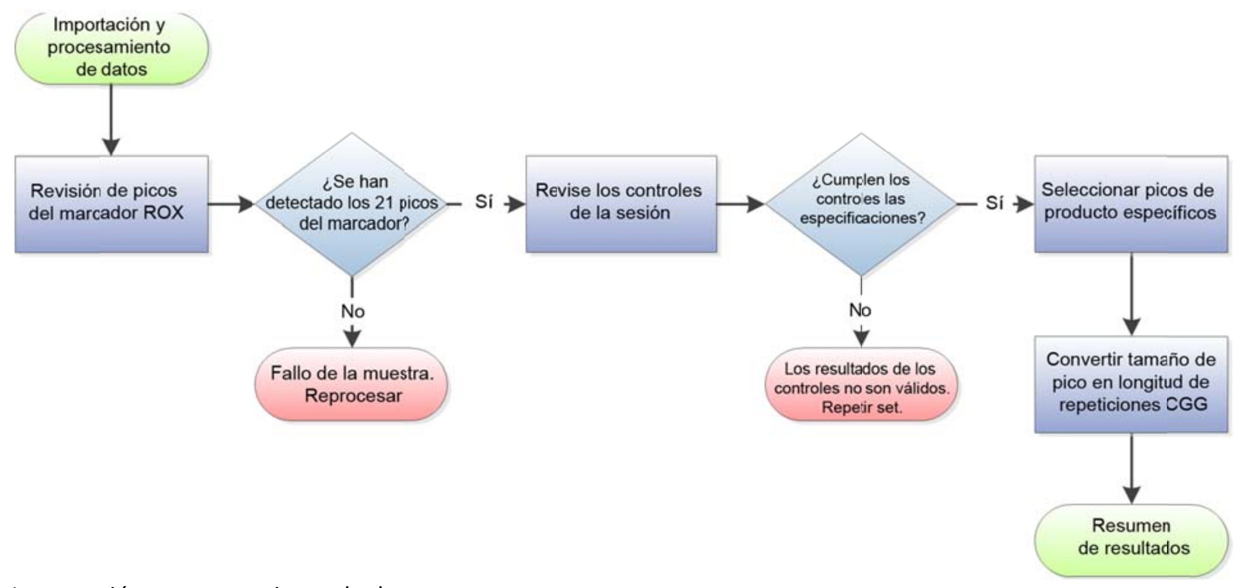
Es preciso usar controles positivos y negativos en cada serie. El diluyente proporcionado con el kit puede utilizarse como control negativo sin ADN. El ADN genómico extraído de líneas celulares bien caracterizadas puede utilizarse para los controles positivos. Las líneas celulares o el ADN genómico purificado correspondiente pueden obtenerse de diversos depósitos, como el CCR [18]. Además, existe un panel de materiales de referencia proporcionado por la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG) y aprobado como estándar internacional por el Comité de Expertos en Patrones Biológicos (ECBS) de la OMS [19]. En la sección de interpretación de datos pueden verse ejemplos representativos obtenidos con estos materiales. Los controles positivos y negativos tienen que estar dentro del rango especificado de aceptación de datos.

1. Asegúrese de que el control negativo incluido en la carrera cumple las especificaciones.
2. Asimismo, asegúrese de que los controles positivos cumplen también las especificaciones correspondientes. Consulte ejemplos de los controles en la sección de interpretación de los datos, parte II (página 19), para obtener más información.

Procedimiento informático

Para el análisis del tamaño de los fragmentos de la PCR específica o con cebadores repetidos (RP) CGG se puede utilizar GeneMapper 4.0/4.1 o un software equivalente. Esto implica una serie de pasos para obtener el tamaño de picos de producto de longitud completa, así como para identificar las características de la carrera para la correcta interpretación de los datos. Los resultados se convierten en longitud de repeticiones CGG tal como se describe en la sección de análisis de los datos. Los términos utilizados para el análisis se refieren a las funciones del GeneMapper 4.0/4.1. En la Figura 5 se muestra una visión global del procedimiento de trabajo para el análisis del tamaño de los fragmentos.

Figura 5. Esquema del flujo de trabajo para el análisis de datos, incluido el procesamiento de los archivos de muestra, la puntuación de picos del marcador, la calificación de la ejecución de la sesión, la selección de picos específicos y el resumen de resultados.



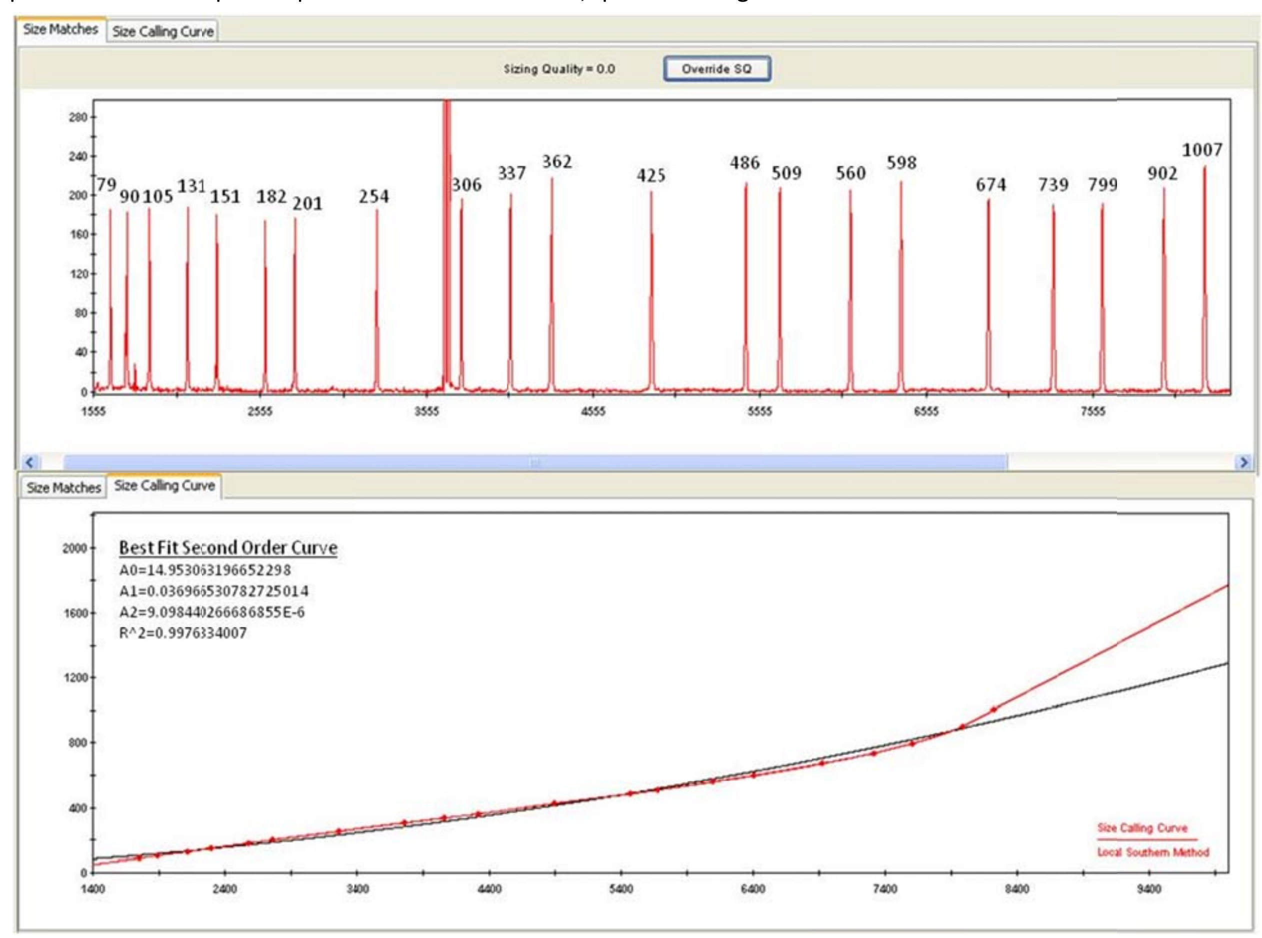
1. Importación y procesamiento de datos
   a. Importe los archivos *.fsa al GeneMapper®.
   b. Procese los archivos según el método de análisis, el panel y el estándar de tamaño establecidos para el análisis de productos de la PCR del *FMR1*.
2. Revisión de la serie
   a. Cribe los picos del marcador ROX.
   Revise los picos y la asignación de tamaños y la curva de coincidencias de tamaños del marcador ROX 1000

para todas las muestras. Identifique todas las irregularidades en el acoplamiento o cualquier pico que falte en el marcador.

Atención: Las muestras sin un marcador correctamente procesado deben excluirse de los análisis posteriores.

Nota: Puede observarse un pico espectral ascendente desde el canal FAM. Por lo general, este pico no interferirá en los tamaños del marcador. Pueden observarse picos dobles, por ejemplo, 90 y 151, que no interfieren con la función del marcador. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de los picos con los distintos tamaños del marcador ROX 1000 y de la curva de coincidencias.

Figura 6. Picos con tamaños asignados (Size Matches) y Curva de coincidencia de tamaños (Size Calling Curve) para el ROX 1000. La vista de Size Matches resalta los 21 picos del marcador e incluye un ejemplo de pico ascendente espectral procedente del canal FAM, que debería ignorarse en el canal ROX.



b. Revise los controles de la sesión

   i. Asegúrese de que el control negativo incluido en la carrera cumple las especificaciones.

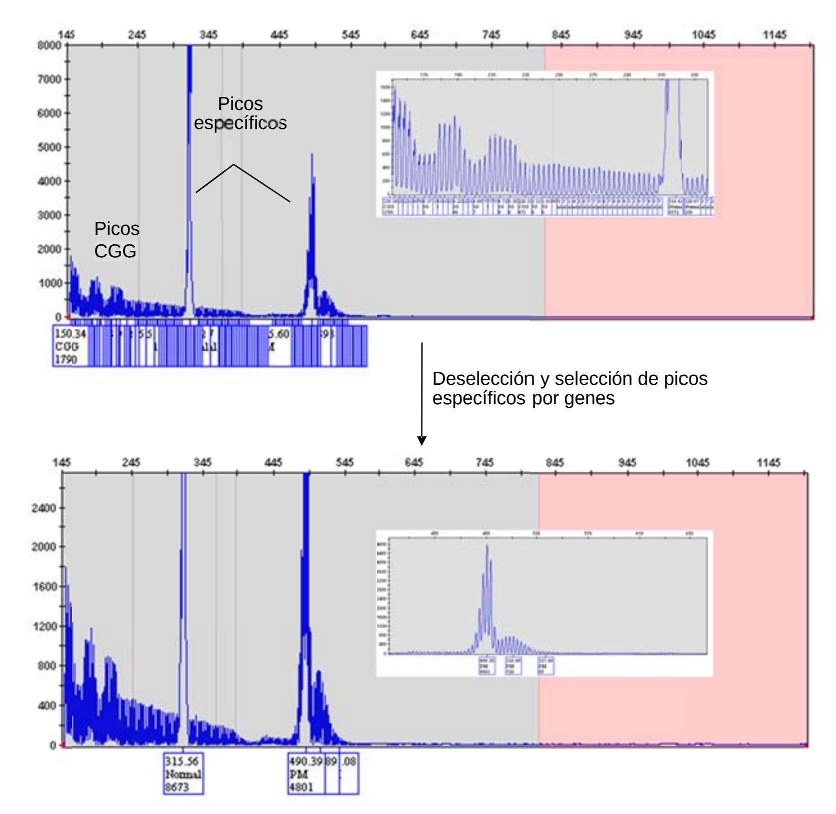
   ii. Asimismo, asegúrese de que los controles positivos cumplen también las especificaciones correspondientes. Consulte ejemplos de los controles en la sección de interpretación de los datos, parte II (página 19), para obtener más información sobre el uso de controles positivos.

3. Seleccione picos diana específicos.

a. Los trazos del electroferograma se revisan para ver si se cumplen los criterios de selección de picos. Para el análisis de los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG, los múltiples picos de RP CGG se deseleccionan para simplificar la conversión del pico de los productos de longitud completa de la PCR específica en la longitud de repeticiones CGG. En la

b. **Figura 7** incluida a continuación se resalta un ejemplo de este proceso relativo a un alelo con premutación de mujer.

Figura 7. Electroferograma de ejemplo con ajustes de análisis predeterminados (arriba) y solo picos de longitud completa específicos seleccionados a partir del electroferograma de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG (abajo).



Nota: Si se procesan los resultados de una PCR específica, solo estarán presentes los picos específicos del gen y solo será preciso seleccionar estos picos. No se requiere la deselección.

c. Deseleccione todos los picos y, a continuación, seleccione los picos de productos de longitud completa específicos. En general, los picos que superan un límite específico del instrumento se seleccionan automáticamente. Los picos de intensidad baja o mínima pueden seleccionarse manualmente según las directrices especificadas en la Tabla 8.

Tabla 8. Límites predeterminados en la intensidad de la señal y rangos de pico bajos para las diferentes configuraciones del instrumento de EC.

Instrumento	Límite	Rango de pico bajo
3130, 3130*xl*	50 rfu	10-49 rfu
3730, 3730*xl*	175 rfu	50-174 rfu
3500, 3500xL	175 rfu	50-174 rfu

d. Tras deseleccionar los picos en todas las muestras, identifique los picos de productos de longitud completa específicos para cada región del electroferograma utilizando las directrices de la Tabla 9.

i. Los picos de intensidad de señal más baja pueden identificarse si están en el rango de pico bajo.

ii. Elimine los picos extra de la muestra o los picos con morfología de repetición no CGG.

Tabla 9. Directrices de selección de picos basadas en el rango de tamaño y en las características. Los gráficos de ejemplo se muestran en la sección de interpretación de los datos.

Si el tamaño del pico se encuentra en este rango	**O** tiene estas características…	**Entonces** siga estas directrices para los picos que superan el límite de señal del instrumento	**Usando** los siguientes ejemplos.
245-400 pb	Alelos normales e intermedios	Seleccione el pico más alto, por lo general, el pico más a la derecha en este rango de tamaño. Puede haber múltiples picos en el rango normal. Confirme la selección de todos los picos (por ejemplo, 30 o 29,30 o 29,31 CGG).	
~400-820 pb	Alelos con premutación con un solo conjunto de picos y con menos de 8 picos desde el centro al extremo.	Seleccione el pico más alto, por lo general el pico central en el caso de alelos de múltiples picos o de los picos en este rango de tamaño (por ejemplo 119 CGG).	
	Alelos con premutación, con distribuciones complejas de picos.	Seleccione los picos centrales de dos grupos de alelos. Si los picos entre alelos superan el límite de señal, identifique ambos grupos separados por un guion "-" (por ejemplo, 112-117 CGG).	
		Si los picos entre dos grupos de alelos son inferiores a 50 rfu (u otro límite), los alelos pueden identificarse con una coma como alelos distintos (por ejemplo, 97, 105 CGG).	
		Seleccione el pico central y último pico >50 rfu (u otro límite) para alelos con más de 8 picos desde el centro hasta el extremo (por ejemplo, 92 a 104 CGG).	

Si el tamaño del pico se encuentra en este rango	**O** tiene estas características…	**Entonces** siga estas directrices para los picos que superan el límite de señal del instrumento	**Usando** los siguientes ejemplos.
>820 pb	Alelos con mutación completa de menos de aproximadamente 1.000 pb que pueden resolverse a partir de picos con mutación completa más grandes y alelos con mutación completa.	Seleccione solo el componente del grupo de picos que contenga el pico más alto. Deseleccione otros picos dentro de este grupo. Identifique los picos como >200 CGG.	>200 CGG >200 CGG

Interpretación de los datos

Descripción general

La interpretación de los datos incluye tres conjuntos de información:

1. El cálculo de la longitud de repeticiones CGG
2. Interpretación y notificación de los resultados de las pruebas
3. Características especiales de los resultados de los ensayos

Parte I: Cálculo de la longitud de repeticiones CGG

Conversión del tamaño del pico en la longitud de repeticiones CGG

Después de la electroforesis capilar, el tamaño del amplicón diana se deriva de la comparación con un estándar de tamaño coinyectado, como puede ser un marcador ROX 1000. No obstante, los productos de PCR de las regiones de repetición del triplete tienen una migración anormalmente más rápida que el ADN genérico del estándar de tamaño [20, 21]. Esta mayor rapidez en la migración, atribuida a la estructura del ADN rico en GC, puede dar lugar a una longitud de repeticiones más corta si no se utiliza un factor de corrección apropiado. El kit AmplideX™ *FMR1* PCR incorpora dos factores de corrección para convertir el tamaño en pares de bases en el número de repeticiones CGG de cada alelo. El tamaño de cada pico se convierte en longitud de repeticiones según la Ecuación :

Ecuación 1.

$$CGG_i = \frac{Peak_i - c_0}{m_0}$$

Donde: $Peak_i$ es el tamaño en pares de bases de un producto dado; c_0 es un factor de corrección del tamaño y m_0 es el factor de corrección de la movilidad para cada repetición CGG. El factor de corrección de tamaño representa la región común del ADN incluida en los cebadores, pero omitiendo las repeticiones CGG. El factor de movilidad representa la movilidad aparente de cada unidad de repetición. Los amplicones que contienen CGG tendrán factores de corrección ligeramente diferentes dependiendo de las condiciones específicas de la ejecución y de la configuración del instrumento que se esté utilizando. En la Tabla 10 se muestran los factores de corrección para las configuraciones soportadas.

Tabla 10. Factores de corrección de tamaño y movilidad para configuraciones de instrumentos estándar.

Configuración	c_0	m_0

Configuración		c_0	m_0
3130, 3130*xl*,	36 cm	229,4	2,965
3730, 3730*xl*,	50 cm	231,9	2,937
3500, 3500xL,	50 cm	232,6	2,962

No están validados factores de corrección para otros instrumentos, longitudes de capilar, tipos de polímero y condiciones de ensayo, pero pueden determinarse utilizando los procedimientos descritos en el procedimiento de calibración (página 12).

Parte II: Interpretación y notificación de los resultados

Los alelos se describen como repeticiones de número entero asociadas a una categoría de genotipo específica: normales, intermedios, con premutación, con mutación completa y mosaico con mutación completa. Los resultados oscilan entre 5 y 200 repeticiones; por encima de 200 repeticiones, todos los alelos se identifican como >200 CGG.

Describa el genotipo para los alelos asignados según el rango de referencia. En muestras con múltiples alelos, se especifica el alelo más largo. Las muestras con alelos con premutación y con mutación completa se identifican como mosaicos con mutación completa [22]. El genotipo puede asignarse según directrices específicas, tal como se muestra en la Tabla 12 de la sección de valores para las decisiones médicas (página 23).

- Ejemplo de resultados de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG para alelos normales, con premutación y con mutación completa

Figura 8. Ejemplos de alelos normales que muestran 29, 30 CGG comparado con 30 CGG.

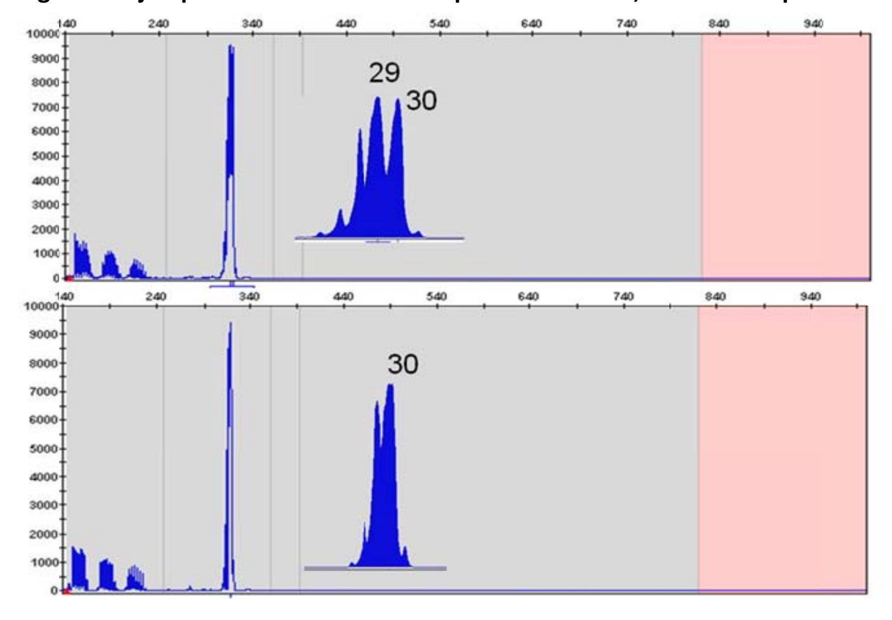


Figura 9. Ejemplo de alelo con premutación. El pico más alto en la muestra se selecciona para representar el alelo 80 CGG.

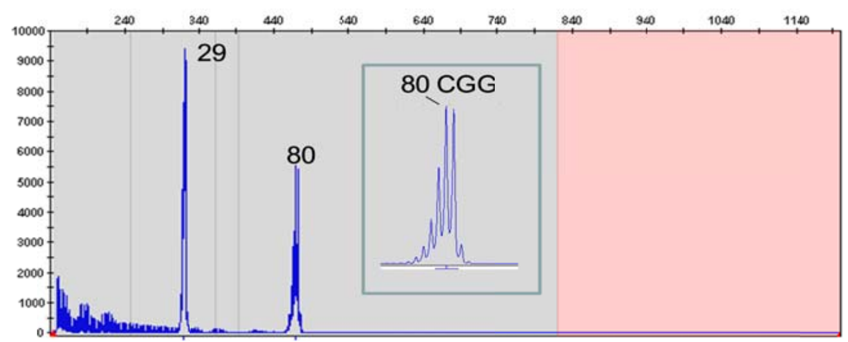
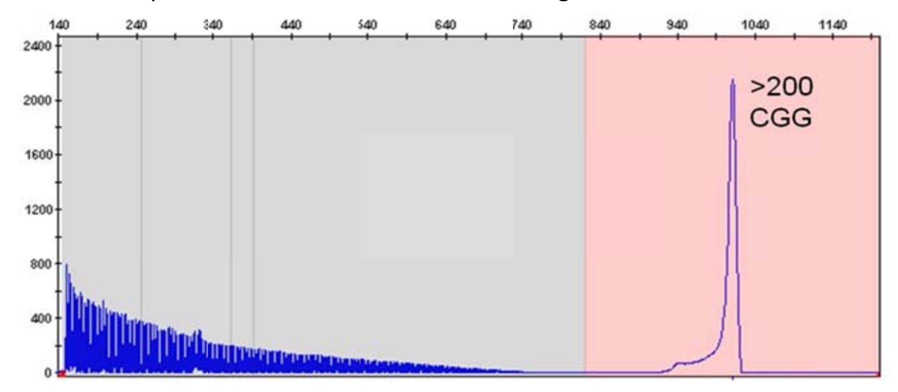


Figura 10. Ejemplo de alelo con mutación completa; muestra de un hombre. El pico de producto de longitud completa supera 200 CGG y se identifica como >200 CGG. Los picos de productos de repetición CGG individuales pueden identificarse fácilmente en el gráfico.



- <u>Trazabilidad de los estándares del X frágil</u>

  En la **Figura 11** pueden apreciarse electroferogramas obtenidos con el panel del material de referencia emitido por la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG) y aprobados como Estándar Internacional por la OMS. El panel consta de cinco muestras de ADN genómico:

Figura 11. Electroferogramas del panel internacional del X frágil de la OMS (NIBSC n.º 08-158).

En la

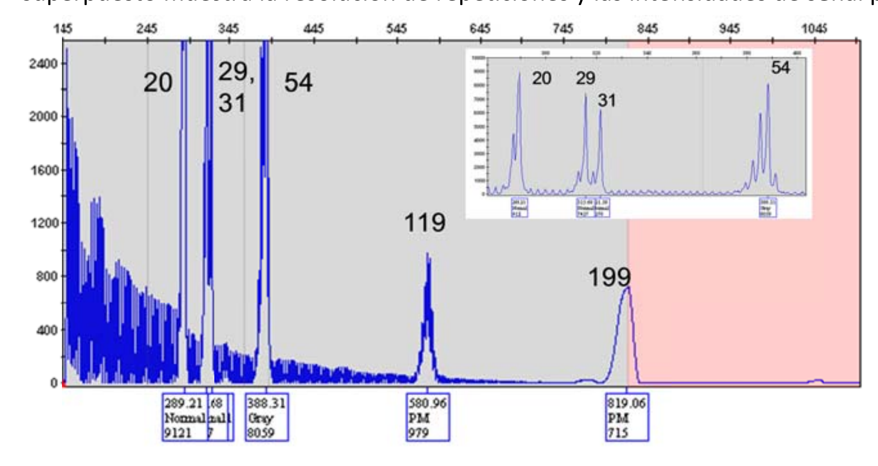
Tabla 11 se presenta un resumen de los principales picos detectados y una comparación con los rangos de resultados y los tamaños medios de estos materiales de referencia. Los resultados del kit AmplideX™ *FMR1* PCR coincidieron en los dos centros y también con los resultados publicados de 27 centros europeos que utilizaron diversas metodologías de PCR para *FMR*1.

Tabla 11. Resumen de los resultados del panel X frágil de la OMS (número de repeticiones CGG) en 2 centros.

Estándares de la OMS y resultados de evaluación internacional [19]				Resultados del kit AmplideX™ *FMR1* PCR	
ID de la muestra	**Descripción de la muestra**	**Rango**	**Media**	**Centro 1**	**Centro 2**
07/120	Mujer, tipo salvaje	19-24 28-33	22 31	22 31	22 31
07/122	Mujer, premutación	30-36 100-132	33 113	34 105, 116	34 105, 115
07/168	Mujer, mutación completa	33-41 300-401	38 346	39 >200	39 >200
07/170	Hombre, mutación completa	353-960	754	>200	>200
07/174	Hombre, premutación	97-127	114	112, 119	112, 119

También pueden utilizarse como controles muestras de ADN de línea celular bien caracterizadas procedentes del Coriell Cell Repository [17, 18]. Las combinaciones de muestras de ADN de línea celular pueden generar un control agrupado rico en información en una PCR. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de resultado de electroferograma correspondiente a una muestra de control agrupado que combina un ADN de cuatro líneas celulares del CCR. Consulte la sección del procedimiento de calibración para conocer la formulación de este control agrupado. Estas cuatro líneas celulares ofrecen alelos *FMR1* correspondientes a 20, 29, 31, 54, 119 y 199 repeticiones CGG. Las longitudes de repeticiones de los primeros cinco alelos se verificaron por secuenciación de Sanger [23]. Por lo tanto, el kit AmplideX™ *FMR1* PCR es trazable al método de secuenciación de ADN y a los materiales del panel del X frágil que pueden solicitarse al NIBSC.

Figura 12. Electroferograma de un control agrupado que muestra los resultados de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG para cuatro líneas celulares que abarcan 20, 29, 31, 54, 119 y 199 CGG. El trazado superpuesto muestra la resolución de repeticiones y las intensidades de señal para los primeros cuatro alelos.



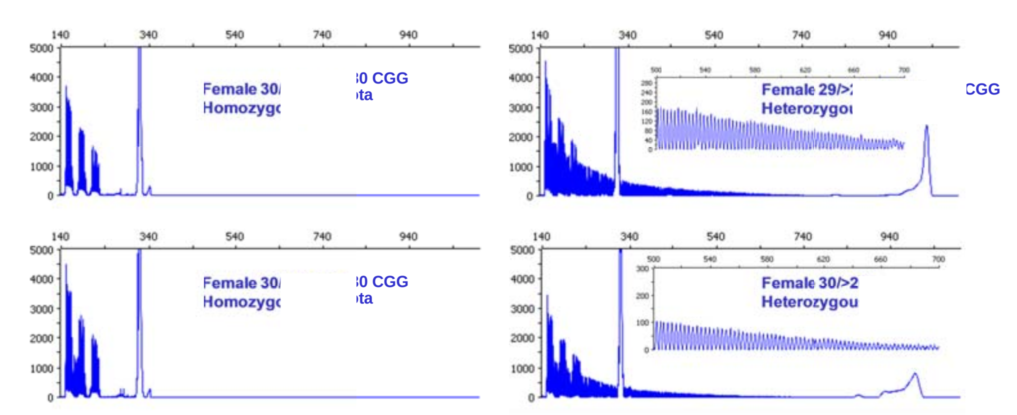
Parte III: Características especiales

- Resolución de la cigosidad.

  La PCR con cebadores repetidos (RP) CGG ofrece una señal única para distinguir los alelos homocigotos de los heterocigotos. En la **Figura 13** se muestran perfiles de ejemplo para alelos homocigotos y heterocigotos. Los productos de la PCR procedentes de alelos homocigotos revelan una señal de línea base después de los picos de repeticiones CGG que se extiende hasta el pico de producto de longitud completa y continúa hasta el final del electroferograma. A la inversa, los alelos heterocigotos tienen un patrón de "decaimiento" característico de productos de repeticiones CGG que superan el rango normal de la longitud de repeticiones CGG, a lo largo de la

detección de alelos normales y expandidos. Además, los productos de cebado repetido CGG se generarán incluso si no se detecta el pico de producto con longitud completa.

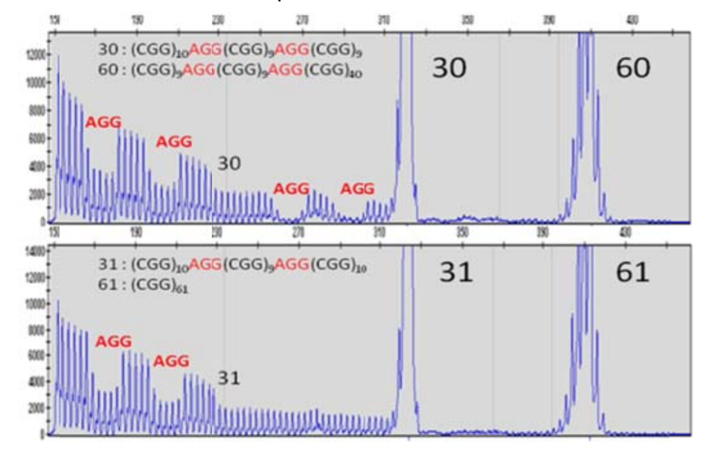
Figura 13. Los reactivos *FMR1* para la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG ofrecen una señal inequívoca de muestras de mujeres que resuelve la cigosidad. Los gráficos superpuestos muestran la resolución y las intensidades de señal de los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG en el rango de 500 a 700 pb. Cada pico del amplicón con cebadores repetidos (RP) CGG está separado por 3 pb.



- Variación de la intensidad de la señal en perfiles de PCR con cebadores repetidos (RP) CGG

  El *cebador CGG* FMR1 es específico de las repeticiones CGG y no se hibrida con las secuencias AGG que se suelen encontrar en los alelos del *FMR1*. Por lo tanto, las interrupciones en la intensidad de la señal del perfil de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG corresponden a la presencia del AGG intercalado. Se piensa que las "interrupciones" AGG confieren estabilidad al ADN y reducen el riesgo de expansión en la generación siguiente [10-13]. La Figura 14 siguiente muestra un ejemplo representativo con 2 muestras de longitud casi idéntica, un alelo 30,60 y uno 31,61.

Figura 14. Electroferogramas que comparan una muestra de 30,60 CGG con AGG en ambos alelos (arriba), frente a una muestra de longitud similar, 31,61 CGG con AGG solamente en el alelo 31 CGG (abajo). El alelo 61 CGG no tiene interrupciones AGG.



El perfil de picos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG mostró 4 AGG para la primera muestra y solamente 2 AGG para la segunda muestra. Basándose en el recuento de picos y en la inferencia de haplotipos para la localización de las secuencias AGG [24, 25], es posible deducir en muchos casos el patrón exacto de repeticiones CGG y de interrupciones AGG, incluso en muestras de mujeres.

Limitaciones del procedimiento de examen

- Es posible que esta prueba no detecte formas poco frecuentes de deficiencia de FMRP no causadas por la expansión de CGG, tales como la eliminación o la mutación puntual, o el retraso mental asociado a otros lugares

frágiles. En estos casos, los estudios de enlaces, citogenéticos o de secuenciación, así como los ensayos diseñados para identificar mutaciones y eliminaciones poco frecuentes, pueden ofrecer información adicional importante.

- Los cebadores F,R FAM del *FMR1* y los cebadores CGG del *FMR1* carecen de lugares de unión polimórficos tal como los definidos por la base de datos Single Nucleotide Polymorphism, versión dbSNP, build 131, y Human Genome Build 37.1. Sin embargo, la presencia de variantes poco frecuentes del gen *FMR1* puede hacer que se obtengan resultados falsos o "miscalls" (predicciones erróneas). Por lo tanto, los resultados del ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta otros datos de laboratorio y el estado clínico global del paciente. Esta prueba no debe utilizarse por sí sola para diagnosticar el síndrome del X frágil o los trastornos asociados al X frágil.

Valores para las decisiones médicas

Intervalos de referencia biológica

Los alelos con mutación completa abarcan de 200 a más de 1.000 repeticiones. Por encima de 200 repeticiones, el fenotipo del FXS se asocia al estado de metilación del alelo, y no necesariamente al número de repeticiones superiores a 200 CGG [8]. En el caso de los alelos con premutación (de aprox. 60 a 200 repeticiones), el riesgo de expansión a una mutación completa aumenta con el tamaño. Por encima de 100 repeticiones, existe un riesgo sistemático de expansión en la siguiente generación [9]. Los límites en las longitudes de repeticiones CGG entre alelos normales, intermedios y con premutación están asociados a las longitudes de repetición más pequeñas que pueden expandirse a una mutación completa. En la Tabla 12 se muestran los límites actuales según el Colegio Americano de Genética Médica y la Sociedad Europea de Genética Humana [22, 26, 27]. Según las pautas locales, los límites pueden ser diferentes en otras regiones.

Tabla 12. Límites de los genotipos relativos a varias longitudes de repeticiones CGG en el gen *FMR1* según la región.

Categoría del genotipo	Directrices ACMG	Directrices ESHG
Normales	<44	<50
Intermedios	45-54	50-58
Premutación	55-200	59-200
Mutación completa	>200	>200

Características de rendimiento

Analíticas

- Especificidad analítica

  Los cebadores directo ("forward") e inverso ("reverse") son específicos del gen del retraso mental humano (*FMR1*) X frágil (NC_000023.10) y abarcan la región de repeticiones CGG dentro de la región 5' no traducida (UTR) del gen (NT_011681.16, Human Chromosome X Contig, Reference Assembly). La amplificación específica del alelo *FMR1* se verificó mediante la secuenciación del ADN y comprobando líneas celulares bien caracterizadas y muestras clínicas representativas.

- Rango de partida de ADN

  El rango del ADN de partida se evaluó por primera vez con 1 a 100 ng de ADN de línea celular. Los productos de longitud completa de la PCR específica y con cebadores repetidos (RP) CGG se observaron con todas las cantidades de ADN. La precisión del tamaño no se vio afectada por la cantidad de ADN. Una muestra en mosaico que contenía 20% de 940 CGG en un fondo con 80% de 23 CGG fue testada a continuación en el rango de 1 a 100 ng de ADN. El rango recomendado es de 20 a 80 ng de ADN por PCR.

- Sensibilidad analítica

  La detección de un alelo con mutación completa poco abundante se determinó con 40 ng de partida utilizando una valoración analítica de dos muestras clínicas. Una muestra clínica con mutación completa de hombre se mezcló

con un alelo normal de hombre de 31 CGG para generar diferentes porcentajes del alelo con mutación completa entre 0 y 100%, manteniendo el ADN total constante en 40 ng. Los picos de repeticiones CGG y los picos de producto específicos de longitud completa se detectaron en muestras con tan solo un 1% de mutación completa, lo que equivalía a 400 pg de un alelo con mutación completa en un fondo de 39,6 ng de alelo normal. La intensidad de la señal del pico de producto de longitud completa y los picos con cebadores repetidos (RP) CGG aumentaron al incrementar la cantidad de partida relativa del alelo con mutación completa. El límite de detección para una detección robusta y reproducible de un alelo con mutación completa fue del 5%.

- Exactitud de la medición

  La exactitud de la medición depende del tamaño del amplicón y de la morfología de los picos específicos del gen. Todos los tamaños se determinaron utilizando los picos más altos o centrales para todos los alelos. La exactitud en la medición del tamaño se determinó en comparación con una secuencia de ADN en el rango de 20 a 119 repeticiones. Entre 119 y 200 CGG, la exactitud de la medición de los picos de producto específicos de longitud completa se relacionó con el número de picos individuales CGG de los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG. Por encima de 200 CGG (o aprox. 821 pb), todos los alelos se clasifican en la categoría de >200 CGG.

  La exactitud de la medición se determinó con los controles de ADN de línea celular publicados utilizando la medida de picos específicos y recuento de picos absolutos de los productos de la PCR con cebadores repetidos (RP) CGG y el panel estándar internacional de la OMS para controles del X frágil.

- Precisión

  1. Reproducibilidad

     La reproducibilidad intraserial fue evaluada por un solo usuario en dos instrumentos de EC distintos (3130*xl* y 3500xL) utilizando un único termociclador. Cada serie de PCR constó de 7 réplicas para 6 alelos en el rango de medición (20, 29, 31, 54, 119 y 199) y 9 réplicas para un alelo con mutación completa (940 CGG). La precisión fue evaluada después de la conversión del tamaño del amplicón (pb) en repeticiones CGG (redondeándolas a un número entero) según los factores de corrección de tamaño (C_o) y movilidad (m_o) específicos de cada instrumento (consulte la sección de análisis del tamaño de los fragmentos, página 12). La diferencia máxima en la longitud de repeticiones medida fue de 1 CGG para el alelo 199 (Tabla 13). Estos resultados se corresponden con una coincidencia del 100% entre todas las réplicas para identificar alelos normales, intermedios o con premutación, dentro de la precisión del método (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de la reproducibilidad del método para determinar la longitud de repeticiones CGG.

Instrumento	Característica	20 CGG	29 CGG	31 CGG	54 CGG	119 CGG	199 CGG	940 CGG
3130*xl*	Número de observaciones	7	7	7	7	7	7	9
	Porcentaje de acuerdo	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	CGG mínima	20	29	31	54	119	199	>200
	CGG máxima	20	29	31	54	119	200	
3500xl	Número de observaciones	7	7	7	7	7	7	9
	Porcentaje de acuerdo	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	CGG mínima	20	29	31	54	119	198	>200
	CGG máxima	20	29	31	54	119	199	

  2. Reproducibilidad dentro del laboratorio

     La variabilidad del método dentro del laboratorio se evaluó analizando 7 alelos diferentes que representaban un rango clínicamente relevante de longitudes de repeticiones CGG. Dos usuarios, cada uno utilizando un termociclador distinto, realizaron reacciones PCR en 4 días diferentes a lo largo de un período de 7 días para un total de 8 series de PCR. Cada serie de PCR constó de 7 réplicas para 6 alelos en el rango de medición (20, 29, 31, 54, 119 y 199) y 9 réplicas para un alelo con mutación completa (940 CGG) para un total de 51

productos de PCR específicos del alelo por serie. Todos los productos de PCR se analizaron en dos instrumentos de EC distintos (3130*xl* o 3500xL). Así, se generó un total de 8 x 51 x 2 = 816 resultados de alelos. Independientemente de la serie, el día, el usuario o el instrumento, se obtuvo la misma longitud de repeticiones CGG para los alelos 20, 29 y 31. La diferencia máxima en la longitud de repeticiones medida fue de 1 CGG para los alelos 54 y 119, y de 2 CGG para el alelo 199. Todos los alelos con mutación completa se clasificaron en la categoría >200 CGG. Estos resultados se corresponden con una coincidencia del 100% entre todas las observaciones para identificar alelos normales, intermedios, con premutación o con mutación completa, dentro de la precisión del método (Tabla 14). En la Tabla 15 se incluye también una estimación de la precisión para los tamaños de productos de la PCR correspondientes medidos en pares de base por cada instrumento. Las desviaciones estándar se calcularon utilizando todos los datos observados para cada alelo antes del cálculo de la longitud de repeticiones CGG usando los factores de conversión específicos del instrumento correspondientes (consulte la parte I de la sección de interpretación de los datos, página 18).

Tabla 14. Resumen de la variabilidad del método dentro del laboratorio para determinar la longitud de repeticiones CGG.

Característica	20 CGG Norm.	29 CGG Norm.	31 CGG Norm.	54 CGG Interm.	119 CGG Premut.	199 CGG Premut.	940 CGG Mut. compl.
Número de observaciones	112	112	112	112	112	112	144
Porcentaje de acuerdo	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CGG mínima	20	29	31	53	118	198	>200
CGG máxima	20	29	31	54	119	200	

Tabla 15. Estimación de la precisión del método dentro del laboratorio para medir el tamaño en pares de bases.

Instrumento	Característica	20 CGG	29 CGG	31 CGG	54 CGG	119 CGG	199 CGG	940 CGG
3500xL	Número de observaciones	56	56	56	56	56	56	72
	Mínimo (pb)	291,42	318,14	324,01	390,75	583,08	820,54	1046,15
	Máximo (pb)	293,28	319,62	325,5	392,46	584,46	824,16	1076,14
	Tamaño medio (pb)	292,51	319,01	324,84	391,76	583,91	823,09	1058,67
	Desv. est.	0,45	0,41	0,41	0,44	0,38	1,26	7,72
	%CV	0,15%	0,13%	0,13%	0,11%	0,07%	0,15%	0,73%
3130*xl*	Número de observaciones	56	56	56	56	56	56	72
	Mínimo (pb)	288,95	315,33	321,14	388,04	580,64	818,02	1042,7
	Máximo (pb)	289,79	316,29	322,12	388,96	581,39	822,29	1062,61
	Tamaño medio (pb)	289,45	315,93	321,77	388,58	581,10	820,53	1051,73
	Desv. est.	0,20	0,21	0,21	0,22	0,19	1,16	5,36
	%CV	0,07%	0,07%	0,06%	0,06%	0,03%	0,14%	0,51%

3. Reproducibilidad entre laboratorios

La reproducibilidad entre laboratorios se evaluó comprobando diferentes alelos en el rango de medición (20, 29, 31, 54, 119 y 199 CGG) en tres laboratorios distintos. En el centro 1, el análisis consistió en 7 réplicas, cada una en dos instrumentos de EC distintos (3130*xl* y 3500xL). En el centro 2 se prepararon cuatro réplicas de PCR y se analizaron en un 3130*xl*. En el centro 3 se prepararon cinco réplicas de PCR y se analizaron usando un 3500xL. Así, se generó un total de 11 réplicas para cada resultado de alelo utilizando un 3500xL, y se recogió

un total de 12 réplicas para cada alelo usando un 3130*xl*. Independientemente de la serie, el centro o el instrumento, se obtuvo la misma longitud de repeticiones CGG para los alelos 20, 29, 31, 54 y 119. La única diferencia en la longitud de repeticiones medida fue de 1 CGG para el alelo 199 en el 3130*xl*, y de 2 CGG para el alelo 199 en el 3500xL; ambos se encontraron dentro del rango esperado en esta longitud de repeticiones. Estos resultados se corresponden con una coincidencia del 100% entre todas las observaciones de distintos laboratorios para identificar alelos normales, intermedios o con premutación (Tabla 16).

Tabla 16. Resumen de la reproducibilidad del método entre laboratorios para determinar la longitud de repeticiones CGG.

Instrumento	Característica	20 CGG	29 CGG	31 CGG	54 CGG	119 CGG	199 CGG
3130*xl*	Número de observaciones	12	12	12	12	12	12
	Porcentaje de acuerdo	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	CGG mínima	20	29	31	54	119	199
	CGG máxima	20	29	31	54	119	200
3500xl	Número de observaciones	11	11	11	11	11	11
	Porcentaje de acuerdo	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	CGG mínima	20	29	31	54	119	198
	CGG máxima	20	29	31	54	119	200

- Interferencia

  La bibliografía científica ha documentado que sustancias endógenas y exógenas contenidas en la sangre periférica pueden interferir en los métodos de PCR inhibiendo la actividad de la ADN polimerasa [28, 29]. Por lo tanto, es necesario purificar el ADN antes del paso de amplificación de la PCR. Se ha demostrado que los métodos estándar de extracción del ADN eliminan estos compuestos potencialmente interferentes [30]. El kit AmplideX™ *FMR1* PCR se diseñó para ser compatible con métodos de extracción de ADN comerciales y validados en el laboratorio. Durante la prueba de 196 muestras clínicas representativas no se observó ninguna inhibición.

Rango de medición

- El rango de medición de la longitud de repeticiones es de 5 a 200 CGG. Por encima de 200 CGG todos los alelos se clasifican en la categoría de >200 CGG.

Diagnósticas y clínicas

El kit AmplideX™ *FMR1* PCR se evaluó con un conjunto de 196 muestras clínicas obtenidas de dos centros externos empleando métodos de PCR específica y con cebadores repetidos (RP) CGG. Un conjunto de 146 muestras, caracterizadas previamente mediante el método de Southern blot, se enviaron a Asuragen para su análisis. Las otras 50 muestras se evaluaron en un laboratorio externo. Los técnicos de laboratorio que realizaron el análisis de la PCR asignaron de forma anónima los genotipos de las muestras. Los resultados de ambas metodologías de PCR en cada centro fueron idénticos, y se resumen en la Tabla 17 con una comparación con el método de Southern blot para cada categoría de genotipos en cada centro. El conjunto total de muestras constó de 75 alelos normales (NOR), 6 alelos intermedios (INT), 43 alelos con premutación (PM) y 72 alelos con mutación completa (FM), incluidos algunos alelos con más de 1.000 repeticiones CGG. El índice de aceptación inicial con el kit AmplideX™ *FMR1* PCR fue del 98,5% (193/196); las tres muestras restantes se amplificaron con éxito al repetir la PCR. Todas las muestras de los rangos normal, intermedio, premutación y mutación completa se identificaron correctamente con el kit AmplideX™ *FMR1* PCR.

Tabla 17. Resumen de los genotipos observados de las muestras por centro y metodología comparados con los obtenidos mediante el método de Southern blot.

Categoría	Asuragen (PCR)	Externo (PCR)	Total por PCR	Total por Southern
NOR	42	33	**75**	**75**
INT	3	3	**6**	**6**
PM	33	8	**41**	**43**
Total de FM	68	6	**74**	**72**
Total	146	50	**196**	**196**

En total, 194 de las 196 muestras coincidieron con el método de Southern blot en las mediciones según el genotipo por categorías del alelo *FMR1* más largo. Dos de las muestras con alelos con premutación fácilmente detectables con el kit y el método de Southern blot también presentaron picos de baja intensidad correspondientes a alelos con mutación completa, que solamente pudieron detectarse con el kit. Estos resultados pueden reflejar que la tecnología AmplideX™ basada en la PCR presenta una sensibilidad mayor que el método de Southern blot para alelos con mutación completa de baja abundancia [17, 23]; consulte también el apartado anterior de sensibilidad analítica (página 23).

En la **Tabla 18** se resume el rendimiento de la prueba para la clasificación precisa de alelos con mutación completa.

Tabla 18. Resumen del rendimiento del kit para la detección de alelos con mutación completa en comparación con el método de Southern blot. Positivos: >200 CGG. Negativos: ≤200 CGG.

		AmplideX™ PCR		
		Positivos	**Negativos**	**Total**
Método de Southern	**Positivos**	72	0	72
	Negativos	2*	122	124
	Total	74	122	196

*Estas dos muestras presentaron alelos con premutación con ambos métodos, mientras que los alelos con mutación completa de baja intensidad solamente pudieron detectarse con el kit AmplideX™ *FMR1* PCR [23].

La sensibilidad diagnóstica fue del 100% [95% CI: 94,9-100%], la especificidad diagnóstica fue del 98,4% [95% CI: 94,3-99,6%], y la exactitud global fue del 99% [95% CI: 96,4-99,7%].

Aviso al comprador

1. Este producto está indicado para uso diagnóstico in vitro.
2. El kit para diagnóstico in vitro AmplideX™ *FMR1* PCR con la marca CE se fabrica en EE.UU. únicamente para su exportación. No está permitida su reintroducción en EE.UU.
3. Este producto no puede revenderse, modificarse para su reventa ni utilizarse para fabricar productos comerciales sin la aprobación por escrito de Asuragen.
4. Amplidex™ es una marca registrada de Asuragen, Inc.
5. Este producto está cubierto por la patente estadounidense número 6.270.962 y por las patentes relacionadas emitidas o pendientes, concedidas bajo licencia a Asuragen, Inc. por EPICENTRE Technologies Corporation, 726 Post Road, Madison, WI 53713, EE.UU.
6. La compra de este producto concede al comprador un derecho limitado, no exclusivo y no transferible dentro de las patentes o solicitudes de patentes a usar el producto adquirido para realizar pruebas de diagnóstico molecular

dirigidas al gen *FMR1* o el gen *FMR2*. No se concede ninguna otra licencia al comprador, ya sea de forma explícita, implícita, legal ni de ninguna otra forma.

7. Todos los instrumentos deben mantenerse y utilizarse según las instrucciones del fabricante.
8. Asuragen no se hace responsable en modo alguno (ya sea por motivos contractuales, extracontractuales [incluida la negligencia] o de otro tipo) de ninguna reclamación derivada o relacionada con el uso de este producto. Ninguna parte de este documento excluye o limita cualquier responsabilidad cuya exclusión o limitación por parte de Asuragen sea ilegal.

Bibliografía

1. Verkerk, A.J., et al., *Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.* Cell, 1991. **65**(5): p. 905-14.
2. Hagerman, R.J. and P.J. Hagerman, *Testing for fragile X gene mutations throughout the life span.* Jama, 2008. **300**(20): p. 2419-21.
3. Oostra, B.A. and R. Willemsen, *A fragile balance: FMR1 expression levels.* Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 2**: p. R249-57.
4. Jin, P., R.S. Alisch, and S.T. Warren, *RNA and microRNAs in fragile X mental retardation.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1048-53.
5. Hagerman, R.J. and P.J. Hagerman, *The fragile X premutation: into the phenotypic fold.* Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(3): p. 278-83.
6. Iwahashi, C.K., et al., *Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS.* Brain, 2006. **129**(Pt 1): p. 256-71.
7. Hagerman, R. and P. Hagerman, *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*. 2002, The Johns Hopkins University Press: Baltimore p. 3-109.
8. de Vries, B.B., et al., *Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family.* J Med Genet, 1996. **33**(12): p. 1007-10.
9. Nolin, S.L., et al., *Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 454-64.
10. Zhong, N., et al., *Fragile X "gray zone" alleles: AGG patterns, expansion risks, and associated haplotypes.* Am J Med Genet, 1996. **64**(2): p. 261-5.
11. Fernandez-Carvajal, I., et al., *Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations.* J Mol Diagn, 2009. **11**(4): p. 306-10.
12. Kunst, C.B., et al., *The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing.* J Med Genet, 1997. **34**(8): p. 627-31.
13. Eichler, E.E., et al., *Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene.* Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 88-94.
14. Hagerman, R.J. and P.J. Hagerman, *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*. 3rd ed. 2002, Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 3-109.
15. Saluto, A., et al., *An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene.* J Mol Diagn, 2005. **7**(5): p. 605-12.
16. Ulfelder, K.J. and B.R. McCord, *The separation of DNA by Capillary Electrophoresis*, in *Handbook of Capillary Electrophoresis*, J.P. Landers, Editor. 1997, CRC Press LLC: Salem. p. 347-378.
17. Chen, L., et al., *An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis.* J Mol Diagn, 2010. **12**(5): p. 589-600.
18. Amos Wilson, J., et al., *Consensus Characterization of 16 FMR1 Reference Materials: A Consortium Study.* J Mol Diagn, 2008. **10**(1): p. 2-12.

19. Hawkins, M., et al., *Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome.* Eur J Hum Genet, 2010.
20. Chastain, P.D., 2nd, et al., *Anomalous rapid electrophoretic mobility of DNA containing triplet repeats associated with human disease genes.* Biochemistry, 1995. **34**(49): p. 16125-31.
21. Kiba, Y., L. Zhang, and Y. Baba, *Anomalously fast migration of triplet-repeat DNA in capillary electrophoresis with linear polymer solution.* Electrophoresis, 2003. **24**(3): p. 452-7.
22. Sherman, S., B.A. Pletcher, and D.A. Driscoll, *Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing.* Genet Med, 2005. **7**(8): p. 584-7.
23. Filipovic-Sadic, S., et al., *A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome.* Clin Chem, 2010. **56**(3): p. 399-408.
24. Poon, P.M., et al., *AGG interspersion analysis of the FMR1 CGG repeats in mental retardation of unspecific cause.* Clin Biochem, 2006. **39**(3): p. 244-8.
25. Eichler, E.E., et al., *Haplotype and interspersion analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome.* Hum Mol Genet, 1996. **5**(3): p. 319-30.
26. Spector, E.B., *Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories.* American College of Medical Genetics, 2006.
27. Macpherson, J. and H. Sawyer. *Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome.* . Clinical Molecular Genetics Society 2005 [cited 2011 February]; http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs%20current%20bpgs/Fragile%20X.pdf].
28. Wiedbrauk, D.L., J.C. Werner, and A.M. Drevon, *Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(10): p. 2643-6.
29. Panaccio, M. and A. Lew, *PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(5): p. 1151.
30. Boom, R., et al., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids.* J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 495-503.

Apéndice A: Glosario de símbolos

Símbolo	Descripción
REF	Número de catálogo
LOT	Código de lote
Σ	Contiene suficiente material para <n> pruebas
i	Consulte las instrucciones antes del uso
	Límites de temperatura
	Fecha de caducidad
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
CE	Marca CE
EC REP	Representante autorizada en la Comunidad Europea
	Fabricado por

Kit AmplideX™ *FMR1* PCR
PC-0164ESv5a
Fecha de entrada en vigor: 2012-07

